

KÉTSZÁLÚ ÉS EGYSZÁLÚ ALFA-HELIKÁLIS SZERKEZETI ELEMOK VIZSGÁLATA, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL KÜLÖNBÖZŐ MIOZIN FAROK DOMÉNEKRE

Című doktori értekezés tézisei

Süveges Dániel

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László



Témavezető: Dr. Nyitrai László, egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Budapest, 2011

BEVEZETÉS

A miozinok az aktin filamentum mentén mozgó molekuláris motorok, melyek az eukarióta sejt szinte valamennyi mozgással járó életjelenségében szerepet játszanak az endocitózistól, és az organellum transzporttól kezdve, mindenféle izomkontrakción keresztül, az exocitózisig. Ez a funkcionális sokféleség a miozin-szupercsalád mintegy 35 családjának változatos szerkezetű farok régiójának köszönhető. Dolgozatomban a 2-es osztályba tartozó konvencionális, és a 6-os osztályba tartozó nem-konvencionális miozin farok régiójának kutatása során elért eredményeket ismertetem.

A 2-es osztályba tartozó miozinokat azért szokás konvencionális miozinoknak is nevezni, mert hosszú ideig ezek voltak a miozinok egyetlen ismert képviselői, valamint közülük kerülnek ki a sima-, váz-, és szívizmokban található „izom-miozinok”. A konvencionális miozinok aktivitása, mint minden folyamat a sejtben, szabályozott. A működés szabályozásának szempontjából két alapvető típust különböztetünk meg: vannak regulált, és nem-regulált miozinok. Természetesen az úgynevezett nem-regulált miozinokból felépülő aktomiozin rendszer működése is precíz kontrol alatt áll, de maga a miozin konstitutívan aktív. Az izom működését a miozin aktinhoz való hozzáférhetősége révén, a Ca^{2+} szenzitív troponin-tropomiozin rendszer szabályozza. Ezzel ellentétben az úgynevezett regulált miozinokban az ATPáz aktivitás szabályozása különböző módokon, de a miozin molekulához kötődik.

A szabályozás három fő mechanizmusa a következő: 1) Az esszenciális miozin könnyülánc (ELC) Ca^{2+} kötése révén a puhatestűek vázizomzatát aktiválja, míg a *Physarum* nyálkagomba miozint gátolja. 2) A gerincesek simaizom-, és nem-izom miozin regulációs könnyülánca foszforiláció révén szabályozott. A szabályozást egy specifikus könnyülánc kináz (MLCK) és foszfatáz (MLCP) páros végzi. Mivel nagyon kiterjedt funkciókkal bíró molekuláról van szó, nem meglepő, hogy a MLCK számos jelátviteli út által szabályozott molekula. 3) A simaizom-, és a nem-izom miozin nehézlánc farok régiója közvetlenül foszforilálódik többféle kináz által. A foszforiláció a filamentum képzés befolyásolásán keresztül hat a molekula működésére.

A kikapcsolt állapotú molekulák jellegzetes képet mutatnak elektronmikroszkópos felvételeken: a miozinfejek visszahajolnak a rúdrész felé, és interakcióba lépnek a molekula S2 régiójával. A dimert alkotó egyik fej az S2 egy szakaszát köti, a másik fej visszahajolva nem az S2-höz, hanem az előző fejhez kapcsolódik. Az így létrejövő szerkezetben az aktin

kötése és az ATP hidrolízise is gátolt. A feltekeredés során egy hosszúkás, elnyújtott szerkezetből egy aszimmetrikus, kompaktabb szerkezetet jön létre. Mint látható a kikapcsolt állapot létrejöttéhez szükséges az S2 jelenléte, így a legkisebb, még szabályozás alatt álló miozin fragmentum a HMM. A similaizom miozin kikapcsolt szerkezetének elektronmikroszkópos vizsgálata, és a kiterjedt képanalízis arra utal, hogy a kikapcsolt állapot kialakításában a miozinféjen és az S2-n kívül részt vehet az LMM is.

A 6-os osztályba tartozó nem-konvencionális miozint, hasonlóan a miozin-2-höz, dimernek tartották a farok régióban lévő prediktált *coiled coil* alapján. A *coiled coil* olyan szuperszekunder szerkezeti elem, melyben két, vagy több α -hélix asszociációját stabilizálja a hélixek interakciós felszínén lokalizálódó hidrofób aminosavak között kialakuló interakció. A miozinok között is előforduló kétszálú, parallel *coiled coil*-okra jellemző a szekvenciában látható hét aminosavas ismétlődés, ahol az első és negyedik pozícióban találjuk a hidrofób aminosavakat, valamint jellemző a töltött aminosavak nagy száma, melyek inter- és intrahelikális elektrosztatikus kölcsönhatások révén stabilizálják a szerkezetet. A miozin-6 farok mediális részéből azonban a hidrofób aminosavak teljesen hiányoznak, helyettük az egész szekvencia szinte kizárólag elektrosztatikusan töltött aminosavakból áll. Amelyek ráadásul nagyon szabályos mintázatba rendeződnek: négy pozitívan és négy negatívan töltött aminosavból álló ismétlődést figyelhetünk meg. Tekintettel arra, hogy a fehérje működése szempontjából rendkívül lényeges, hogy képes-e dimert alkotni, fontos megismerni a mediális régió szerkezetét, a szerkezet tulajdonságait. Mert az is elképzelhető, hogy a prediktált *coiled coil*-al ellentétben, ez a motívum is egyszálú α -hélix kialakulását eredményezi, hasonlóan a similaizom kaldezmion mediális részéhez. Sőt, még az is lehet, hogy nem unikális esetről van szó, hanem további fehérjékben is előfordul ez a szekvencia motívum.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az S2 fragmentum szerepe a konvencionális miozinok szabályozásában.

A regulált miozinok szinte minden csoportjáról rendelkezésünkre áll kísérletes adat arra vonatkozóan, hogy a szabályozás a szerkezet nagyfokú átrendeződésével jár, mely során a motordomén az S2 régióval kölcsönhatásba lép.

Célunk volt felderíteni, hogy a két fej találkozását követő proximális rúd szakasz milyen szerepet játszik a kikapcsolt állapot kialakításában.

2. A miozin-6 mediális rúd doménjének szerkezetvizsgálata

A 6-os osztályba tartozó nem-konvencionális miozin fark régiója különleges aminosav mintázattal bír: a négy pozitív, négy negatív aminosavból álló ismétlődés figyelhető meg a szekvenciában. Szerkezet jósló programok ezt a szakaszt α -helikális *coiled coil*-nak tekintették, annak ellenére, hogy a két α -hélixet összetartó hidrofób aminosavak hiányoznak.

A molekula működése szempontjából annak a lényeges kérdésnek akartunk utánajárni, hogy milyen szerkezetet vesz fel ez a szakasz, és valóban képes-e dimerizálni a molekulát.

3. Egyszálú α -helikális motívumok keresése a proteomban

Miután bebizonyosodott, hogy a miozin-6 mediális rúd régiója, a kaldezmönhoz hasonlóan stabil egyszálú α -hélixet képez (CSAH – *charged single α -helix*), vetődött fel a kérdés, hogy milyen más fehérjékben fordul elő ez az aminosav mintázat, és, hogy azokban is hasonló szerkezet kialakulásához vezet-e.

4. A CSAH szekvenciák szerepe fehérjékben

Annak ellenére, hogy mint kiderült, sok fehérjében jelen vannak, viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre, amiből a motívum funkciójára következtethetünk volna. Feltételezhetően erőrkarként és távtartóként lehet szerepe.

Választ kerestem arra a kérdésre, hogy e mechanikai ellenálló képességet, rigiditást igénylő, funkciók betöltéséhez vajon elegendő merevséggel rendelkeznek-e a CSAH szerkezetek.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- A kísérletes munkához különböző fehérjéket kódoló rekombináns DNS konstrukciókat készítettem, majd a vizsgálni kívánt fehérjéket *E. coli* heterológ expressziós rendszerben termeltem, majd tisztítottam.
- A konvencionális miozin proximális rúd stabilitásának vizsgálatára differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) és cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás módszert használtam.
- Az egyszálú α -hélixekre jellemző szekvencia motívum keresésére két, elveiben különböző predikciós módszert fejlesztettünk. A predikciók eredményeként kapott találatok közül CD spektroszkópiás módszerrel ellenőriztünk néhány CSAH szekvenciát a predikciók jóságának ellenőrzésére.
- A szerkezet stabilitását CD spektroszkópiás módszerrel követtem a hőmérséklet, ionerő és pH függvényében.
- A CSAH szerkezetének dimert képző képességét koncentrációfüggő CD spektroszkópiás, keresztkötéses valamint fluoreszcenciás módszerrel próbáltam kimutatni.
- A CSAH szerkezetek stabilitásának vizsgálatához molekuladinamikai szimulációt végeztük, majd a trajektóriákból saját fejlesztésű programok segítségével meghatároztuk a polimerre jellemző mechanikai paramétereket, a perzisztencia hosszt, és a Young modulust.

EREDMÉNYEK

Különböző konvencionális miozinokból származó proximális S2 fragmentumok vizsgálatából megállapítottuk, hogy erős korreláció figyelhető meg a miozin szabályozása és a két fej találkozását követő *coiled coil* stabilitása között. Az úgynevezett regulált miozinoknál, ahol a szabályozás a miozin aktivitását befolyásolja, a szabályozás a szerkezet nagymértékű átrendeződésével jár, ott a vizsgált S2 fragmentum stabilitása kisebb lesz, amit azzal magyarázhatunk, hogy a kikapcsolt állapot során a miozin fejek visszahajlása a szakasz részleges letékeredésével jár, aminek egy instabilabb szerkezet jobban kedvez. Ezt a feltételezést támasztja alá a 2,3 Å felbontással meghatározott kagylóból származó S2 térszerkezet is, amiben a kisebb stabilitásra az N-terminális irányban növekvő B faktor, és a hidrofób varratot alkotó aminosavak kevésbé meghatározott szerkezete utal.

A 6-os osztályba tartozó nem konvencionális miozin *coiled coil*-nak prediktált fragmentumával végzett mérések szerint a nagy töltéssűrűséggel, és jellegzetes töltés mintázattal rendelkező mediális fark régió a predikciókkal ellentétben stabil, egyszálú α -hélixet képez (CSAH – *charged single α -helix*). Ennek a hélixnek a dimerizációra való hajlamát se CD spektroszkópiás, se keresztkötéses, se fluoreszcenciás kísérletekkel sem sikerült kimutatni.

Sikeresen kifejlesztettünk a miozin-6 mediális fark régiójában található aminosavmintázatot keresésére alkalmas két különböző programot. A több tucat CSAH motívumot tartalmazó fehérjéből kísérletes vizsgálat megerősítette a predikciók jóságát. A predikciós programokat egy weboldalon elérhetővé tettük az érdeklődő kutatók számára, így online bárki ellenőrizheti a CSAH motívum előfordulását az általa vizsgált fehérje szekvenciájában. (A weboldal címe: <http://himalia.chem.elte.hu/cgi-bin/csahserver.cgi>)

A CSAH motívumokon végzett molekuladinamikai szimulációk segítségével megállapíthattuk, hogy a peptidek valóban α -helikális szerkezetet vesznek fel, ami a megfigyelt 160 ns-nyi szimulációs időben megőrizte stabilitását. A szerkezetek a polialaninnal ellentétben, ami ugyancsak magas α -hélixtartalommal rendelkezik, nem töredezett (*semibroken rod*), hanem rúdszerű hélixet képez. A trajektóriák elemzése kimutatta, hogy a szerkezet stabilizálásában a várakozásoknak megfelelően nagy szerepet játszik az i , $i+3$ és az i , $i+4$ pozícióban elhelyezkedő ellentétes töltésű aminosavak között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás.

A molekuladinamikai szimulációk a fehérjékben betöltött funkcióra vonatkozóan is szolgáltatnak információt: a trajektóriák elemzéséből az egyensúlyi fluktuációk alapján meghatározhattuk a polimerszál mechanikai jellemzéséhez szükséges paramétereket: a perzisztenciahosszt és a Young modulust. Ezek a paraméterek a polimerszál nagyfokú rigiditásáról árulkodtak (az 50 nm körüli perszisztenciahossz megfelel a DNS perzisztenciahosszára vonatkozó irodalmi értéknek), mely lehetővé teszi a feltételezett erőkar, és távtartó szerepet.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A doktori dolgozat témájában megjelent közlemények

Brown JH, Yang Y, Reshetnikova L, Gourinath S, **Süveges D**, Kardos J, Hóbor F, Reutzel R, Nyitray L, Cohen C. (2008): An unstable head-rod junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins.
J Mol Biol., 375(5):1434-43.

D. Süveges, L. Nyitray (2008): Kétszálú és magányos α -hélixek: két sokoldalú fehérjeszerkezeti elem
Biokémia (A Magyar Biokémiai Egyesület kiadványa) 32/4: 92–94.
<http://www.mbkegy.hu/docs/biokemf/pdf/b200812.pdf>

D. Süveges, Z. Gáspári, G. Tóth, L. Nyitray (2009): Charged single α -helix: a versatile protein structural motif.
Proteins. 74(4):905-16

Z. Gáspári, **D. Süveges**, L. Nyitray, G. Tóth: Consensus prediction of charged single α -helices by the CSAH server.
Kézirat beküldés előtt

L. M. Espinoza-Fonseca, **D. Süveges**, I. Derényi, L. Nyitray: Structural and dynamic properties of charged single α -helices
Kézirat előkészületben

Egyéb közlemények

B. Szappanos, **D. Süveges**, L. Nyitray, A. Perczel, Z. Gáspári (2010): Folded-unfolded cross-predictions and protein evolution: the case study of coiled coils
FEBS Lett. 584(8):1623-7.

L. Radnai, P. Rapali, Z. Hodi, **D. Süveges**, T. Molnár, B. Kiss, B. Bécsi, F. Erdődi, J. Kardos, M. Kovács, L. Nyitray (2010): Affinity, avidity and kinetics of targeted sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms
J Biol Chem. 2010 Dec 3;285(49):38649-57

P. Rapali, L. Radnai, **D. Süveges**, W.Y. Wahlgren, V. Harmat, L. Nyitray, G. Pál (2010): Az LC8 dinein könnyűlánc kötőmotívumának jellemzése, és új kölcsönható partnerek jóslása irányított evolúció segítségével.
Biokémia (A Magyar BiokémiaiEgyesület kiadványa) 36/4: 28–34.
<http://www.mbkegy.hu/docs/biokemf/pdf/b201012.pdf>

P. Rapali, L. Radnai, **D. Süveges**, C. Hetényi, V. Harmat, F. Tölgyesi, W.Y. Wahlgren, G. Katona, L. Nyitray, G. Pál (2010): Binding motif preference of DYNLL mapped by *in vitro* evolved peptides: creating a tight-binding peptide and predicting novel binding partners.
Plos One – Birálat alatt.

Konferencia kiadványok

- D. Süveges**, Cs. Hetényi, Z. Gáspári, G. Tóth, and L. Nyitray (2005): Helical Tail fragments of myosin VI, exist as a monomeric highly flexible structures
European Muscle Conference, Hortobágy, Hungary; J. Muscle Res. Cell Motility. 26:74
- D. Süveges**, Z. Gáspári, G. Tóth, and L. Nyitray (2007): Prediction of highly charged single α -helical structures in proteins.
32nd FEBS Congress, Vienna, Austria; FEBS J., 274: 256
- F. Hóbor, **D. Süveges**, J. Kardos, J. H. Brown, C. Cohen, L. Nyitray (2008): Possible structural basis of different regulation of myosin II isoforms
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary
- G. Pohl, P. Stráner, L. Radnai, **D. Süveges**, L. Nyitray, A. Perczel (2008): Preparation of uniformly labelled point mutants of TC5b miniprotein for NMR dynamic studies
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary
- P. Rapali, L. Radnai, J. Kardos, **D. Süveges**, T. Molnár, Bence Kiss, Zsuzsa Hódi, László Nyitray (2008): Mechanism of DLC binding to multiple protein partners
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary
- P. Stráner, G. Pohl, A. Láng, **D. Süveges**, L. Nyitray, A. Perczel (2008): Backbone mobility of Trp-cage mutants, skeletal motion of miniproteins
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary
- D. Süveges**, Z. Gáspári, G. Tóth, L. Nyitray (2008): Charged single α -helix: a versatile protein structural motif
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary
- L. M. Espinoza-Fonseca, **D. Süveges**, Z. Gáspári, L. Nyitray (2009): Role of cationic residues in fine tuning flexibility of naturally occurring charged single α -helices
Biophysical Society 53rd Annual Meeting; Biophysical Journal 96(3) pp. 322a
- D. Süveges**, P. Rapali, L. Radnai, W. Y. Wahlgren, G. Katona, L. Nyitray (2010): Echinoderm microtubule associated protein like 3 (EML3): a novel binding partner of the dynein light chain, DYNLL
35th FEBS Congress, Gothenburg, Sweden; FEBS J., 277: 301
- B. Szappanos, **D. Süveges**, G. Tóth, L. Nyitray, A. Perczel, Z. Gáspári (2010): Interrelationships between coiled-coils, intrinsically disordered sequences and charged single α -helices
35th FEBS Congress, Gothenburg, Sweden; FEBS J., 277: 257

